


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12N 15/00, C12Q 1/68 C12M 1/34	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/ 01035 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Februar 1989 (09.02.89)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP88/00659 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Juli 1988 (21.07.88) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 24 442.6 (32) Prioritätsdatum: 23. Juli 1987 (23.07.87) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstraße 1, D-6900 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : ANSORGE, Wilhelm [DE/DE]; Heidelbergerstraße 49, D-6901 Gaiberg b. Heidelberg (DE). KRISTENSEN, Tom [NO/NO]; Sexes gt. 12, N-0577 Oslo 5 (NO). VOSS, Hartmut [DE/DE]; Römerstraße 18, D-6753 Enkenbach-Alsenborn 2 (DE). STEGEMANN, Josef [DE/DE]; Hausackerweg 28, D-6900 Heidelberg (DE). SCHWAGER, Christian [DE/DE];		Albert-Schweitzer-Strasse 4 a, D-6703 Limburgerhof (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Möhlstraße 22, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR PURIFICATION OF M-13 PHAGE DNA (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR REINIGUNG VON M-13-PHAGEN-DNA (57) Abstract To recover recombinant M-13-ss DNA from recombinant M-13 phages expelled into a medium by an E. coli host strain, the M-13 phages are precipitated from the culture medium with acetic acid, the suspension so obtained is filtered through a glass fibre filter, and the glass fibre filter is treated with a solution of chaotropic ions. (57) Zusammenfassung Zur Reingewinnung von rekombinanter M-13-ss-DNA aus von einem E.coli-Wirtstamm ins Medium ausgeschleusten rekombinanten M-13-Phagen fällt man aus dem Wachstumsmedium die M-13-Phagen mit Essigsäure, filtriert die erhaltene Suspension über ein Glasfaserfilter und behandelt das Glasfaserfilter mit einer Lösung chaotroper Ionen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

Verfahren und Vorrichtung zur Reinigung von
M-13-Phagen-DNA

B e s c h r e i b u n g

Bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger (Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 74, 54-63 (1977)) werden von jeder der vier in der DNA vorkommenden Basen 2',3'-Didesoxynucleotidtriphosphate hergestellt, welche von der DNA-Polymerase in einen wachsenden DNA-Strang zwar eingebaut werden, aber mit dem darauf folgenden Desoxynucleotidphosphat keine Phosphodiesterbrücke auszubilden vermögen, so daß die Kette nicht mehr weiterwächst. Wird zur Sequenzierung der zu analysierende DNA-Strang mit einem kurzen Stück markierter DNA (dem Primer) die dem einen Ende des zu analysierenden Stranges komplementär ist, einem der Didesoxynucleotidtriphosphate und den drei anderen normalen Triphosphaten in Gegenwart von DNA-Polymerase umgesetzt, so wird vom Primer ausgehend ein komplementärer Strang zur zu bestimmenden DNA synthetisiert, dessen Kette dort abbricht, wo eine Didesoxyverbindung eingebaut wird. Man erhält so in vier Ansätzen mit jeweils einem der vier Didesoxynucleotidtriphosphate eine Reihe markierter Stränge, die der Größe nach durch Gelchromatographie aufgetrennt und anhand ihrer Markierung sichtbar gemacht werden. Aus dem so erhaltenen Muster läßt sich dann leicht die Sequenz der DNA bestimmen.

Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode besteht darin, daß zuerst ein Endstück des zu analysierenden DNA-Stranges in seiner Sequenz bestimmt werden muß, um den Primer aufbauen zu können. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß es gewöhnlich sehr schwierig ist, eine ausreichende Menge der zu sequenzierenden DNA zur Verfügung zu stellen.

Diese Schwierigkeiten werden mit der M-13-Phagentemplat-Methode (J. Messing, Methods Enzymol 101, 20-78 (1983)) wesentlich vermindert. Bei dieser Methode wird das doppelsträngige Plasmid des M-13-Phagen als Vektor zur Klonierung der zu sequenzierenden DNA derart verwendet, daß das Plasmid an einer bestimmten Stelle mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease aufgeschnitten, in die Öffnung in bekannter Weise die zu sequenzierende DNA insertiert und der so erhaltene Vektor in E.coli kloniert wird. Dabei bildet der E.coli M-13-Phagen, die direkt ins Kulturmedium sezerniert werden und als DNA eine einzelsträngige, circuläre rekombinante M-13-DNA (M-13-ss-DNA) enthalten, in welcher sich die zu sequenzierende DNA befindet. Da die an die Schnittstelle, in die diese DNA insertiert vorliegt, angrenzende Sequenz der Phagen-DNA bekannt ist, kann als Primer stets die dieser bekannten Sequenz komplementäre Sequenz verwendet werden, gleichgültig welche zu sequenzierende DNA in das Plasmid eingefügt wurde. Es kann daher mit einer einzigen Primersequenz eine große Vielzahl von DNA-Strängen sequenziert werden.

Voraussetzung hierfür ist allerdings, daß aus dem vom E.coli sezernierten Phagen die darin enthaltene DNA frei von den sie umhüllenden Proteinen gewonnen wird. Diese Reinigung erfolgte bisher durch Fällung mit Polyethylenglykol, gefolgt von Deproteinisierung durch Extraktionen mit Phenol und Chloroform und schließlich Konzentration der DNA durch Ethanolfällung (M13 Cloning/ Dideoxy Sequencing Instruction Manual, Bethesda Research Laboratories 1986).

Dieses Reinigungsverfahren hat den Nachteil, daß es sehr langsam abläuft und sich nicht automatisieren läßt.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, dieses Reinigungsverfahren so zu verbessern, daß diese Nachteile beseitigt werden und das Verfahren nicht nur wesentlich beschleunigt und vereinfacht wird, sondern der Automatisierung zugänglich wird.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art, bei welchem man aus dem Wachstumsmedium der E.coli-Zellen die M-13-Phagen mit Essigsäure fällt, die erhaltene Suspension über Glasfaserfilter filtriert und das Glasfaserfilter mit einer Lösung chaotroper Ionen behandelt.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die E.coli-Bakterien aus dem Wachstumsmedium abzentrifugiert und der gewonnene Überstand mit Essigsäure versetzt. Die verwendete Essigsäuremenge kann in weiten Grenzen variiert werden und Endkonzentrationen zwischen 1 % und 10 % ergaben praktisch gleiche Ausbeuten an gereinigter DNA. Ein besonderer Vorzug der Fällung mit Essigsäure an Stelle von Polyethylenglykol besteht darin, daß die DNA in hoher Ausbeute praktisch ohne Zeitverzug, also durch sofortige Filtration der Suspension nach dem Zusatz der Essigsäure erhalten wird. Daher können Einwirkungszeiten zwischen etwa 0,5 und 30 Minuten angewendet werden, wobei sich mit zunehmender Dauer der Einwirkung die Ausbeute geringfügig erhöht. Nach kurzer Einwirkungszeit, in der Regel 1 bis 5, vorzugsweise etwa 2 Minuten bei normaler Temperatur wird über ein Glasfaserfilter filtriert, zweckmäßig so, daß die Flüssigkeit durchgesaugt werden kann.

In der nächsten Stufe wird die DNA an das Glas im Glasfaserfilter gebunden. Grundsätzlich eignen sich für diese Verfahrensstufe stark chaotrope Ionen, welche

eine Dissoziation der Phagenproteine von der Phagen-DNA bewirken können. Die besten Ergebnisse wurden mit NaClO_4 -Lösungen erhalten, wobei vorzugsweise eine Konzentration zwischen 3 und 10 M/l, besonders bevorzugt von 4 bis 8 M/l verwendet wird. Gute Ergebnisse wurden auch unter Verwendung von Guanidinium-Hydrochlorid als chaotropes Mittel erhalten.

Die Behandlung mit der Lösung der chaotropen Ionen kann einfach durch Auftropfen auf den Filter und Absaugen erfolgen.

In der bevorzugten Ausführungsform wird der Glasfaserfilter mit einer Perchloratlösung, pH 6,5 bis 8,5, insbesondere pH 7 bis 8 behandelt. Dies erfolgt zweckmäßig durch Auftropfen und Durchsaugen. Besonders bevorzugt wird hierzu eine Lösung, die 4 bis 8 M/l NaClO_4 , 5 bis 20 mM/l Tris-HCl, pH 7 bis 8 und 0,5 bis 2 mM/l EDTA enthält, verwendet

Nach dem Entfernen der Chaotrop-, insbesondere der Natriumperchloratlösung wird vorzugsweise mit wäßrigem Ethanol nachgewaschen, zweckmäßig mit 60 bis 80 %igem Ethanol. Nach dem Trocknen der Filter erfolgt dann die Elution in üblicher Weise mit einer verdünnten wäßrigen Salzlösung, wie z.B. in Anal.Biochem. 101, 339-341 (1980) beschrieben. Ein bevorzugtes Elutionsmittel ist 0,5 bis 2 mM/l Tris-HCl, pH 7 bis 8, enthaltend 0,05 bis 0,2 mM/l EDTA, im folgenden als TE bezeichnet. Besonders bevorzugt wird ein pH-Wert von 7,4 bis 7,6.

Ein anderes geeignetes Elutionsmittel sind verdünnte Detergenslösungen, wie z.B. 0,1 % SDS, die jedoch weniger bevorzugt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur automatisierten Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in Form einer Filtrations- und Elutions-einheit. Sie ist gekennzeichnet durch eine Vakuumkammer 1, die abgedeckt ist mit einer unteren Platte 2 und einer oberen Platte 3, zwischen denen sich ein Glasfaserfilter 4 befindet. Die Platten 2 und 3 weisen eine Vielzahl von miteinander fluchtenden Löchern auf, die durch das Glasfaserfilter 4 geteilt sind. Jede der Platten 2 und 3 besteht vorzugsweise ihrerseits aus einer Sandwich-Struktur, bei der eine elektrisch leitfähige Metallplatte (2c, 3c) zwischen zwei isolierenden Kunststoffplatten (2a, 2b; 3a, 3b) angeordnet ist. Die Metallplatte (2c, 3c) besteht vorzugsweise aus rostfreiem Stahl. Die beiden Metallplatten (2c, 3c) in den Verbundplatten 2 und 3 weisen Mittel zur Verbindung mit einer Spannungsquelle auf, die es ermöglicht, eine geeignete elektrische Spannung zwischen den beiden Platten anzulegen, um eine Elektroelution durchzuführen. Zwischen der Vakuumkammer 1 und der Verbundkammerdeckplatte kann eine Dichtung, z.B. aus Gummi oder Fett angeordnet sein.

Die Elution kann alternativ auch mittels Mikrotiterzentrifuge erfolgen, wobei der ganze Verbund aus Platten 2 und 3 und Filter 4 in die Zentrifuge gegeben werden kann. Die Mittel zur Verbindung der Metallplatten 2c, 3c mit einer Spannungsquelle entfallen dann.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise im Rahmen der DNA-Sequenzierung angewendet. Es läßt sich jedoch auch als rasche und zuverlässige Methode zur Herstellung von M-13-ss-DNA verwenden, wie sie in der Site-gerichteten Mutagenese (gezielte Mutagenese von DNA nach Kramer, Nucl. Acids Res. 12, 9441 (1984)) benötigt wird.

Im folgenden Beispiel wird die Erfindung in Verbindung mit der beigefügten Zeichnung näher beschrieben. In der Zeichnung stellen dar

Fig. 1 eine graphische Darstellung, in welcher 1a die Abhängigkeit der DNA-Ausbeute von der Essigsäurekonzentration in Volumen-%, 1b die DNA-Ausbeute in Abhängigkeit von der Dauer zwischen der Essigsäurezugabe und dem Filtrieren und 1c die DNA-Ausbeute in Abhängigkeit von der verwendeten Natriumperchloratkonzentration zeigen.

Fig. 2 zeigt eine perspektivische Darstellung der erfindungsgemäßen Filtrations- und Elutionseinheit, enthaltend eine Vakuumkammer 1 mit Anschluß zur Vakuumpumpe (nicht gezeigt), die mit einer unteren Kunststoff-Metall-Kunststoffverbundplatte 2 und einer oberen Kunststoff-Metall-Kunststoffverbundplatte 3, zwischen die ein Glasfaserfilter 4 eingelegt ist, abgedeckt ist. Die obere und die untere Verbundplatte weisen eine Reihe von Bohrungen auf, die miteinander fluchten und in der oberen Platte 3 trichterförmig, in der unteren Platte 2 zylindrisch ausgebildet sind.

Fig. 3 zeigt einen Querschnitt durch diese Plattenstruktur.

Fig. 4 zeigt einen Querschnitt durch die Einheit aus oberer und unterer Verbundplatte und eingefügtem Glasfaservlies als Ausschnittvergrößerung. Zwischen den isolierenden Kunststoffplatten 2a und 2b, bzw. 3a und 3b ist jeweils eine entsprechende leitfähige Metallplatte 2c bzw. 3c angeordnet, die elektrisch so geschaltet werden können, daß die Platte 2c als Anode, die Platte 3c als Katode wirkt.

Die dargestellte Ausführungsform weist 96 Löcher auf und gestattet daher die gleichzeitige Reinigung von 96 verschiedenen M-13-Templaten.

B e i s p i e l

Es wurde ein M-13 mp 18 rekombinanter Phage verwendet, der ein 800 Basen langes Proteinkinase cDNA-Insert enthält und in Prot.Natl.Acad.Sci. USA 83, 1300-1304 (1986) beschrieben wird. Dieser rekombinante Phage wird erhalten, in dem man das Insert aus einem pUC 8-Vektor in die doppelsträngige replikative Form des M-13 mp 18-Phagen insertiert und damit kompetente JM 103 E.coli-Zellen transfiziert. Klare Plaques wurden entnommen und in 2 ml Wachstumsmedium 6 Stunden wachsen gelassen. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert.

1 ml der so erhaltenen Phagensuspension wurde in einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 µl Eisessig versetzt, das Röhrchen verschlossen und einmal umgedreht. Nach 2 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Suspension auf ein Glasfaserfilter von 7 mm Durchmesser (GF/C der Fa. Whatman Int. Ltd, England) gegeben, welches durch die 7 mm Durchmesser aufweisende Bohrung der Platten 2 und 3 auf einer Filtrations- und Elutionseinheit gemäß Erfindung mit 96 Bohrungen, wie in den Fig. 2 bis 4 dargestellt, begrenzt ist.

Die Aufgabe der Suspension erfolgte in Aliquots von 0,1 ml. Jedes Aliquot wurde erst aufgegeben, nachdem die vorhergehende Portion durchgesaugt war. Wenn mehrere Proben gleichzeitig behandelt wurden, so erfolgte die Zugabe jeder Probe auf ihr Filter, bevor die nächste Probe auf das nächste Filter aufgebracht wurde.

Anschließend wurde jeder Filter mit insgesamt 1 ml 4 M/l NaClO_4 , 10 mM/l Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM/l EDTA behandelt, wobei ebenfalls 0,1 ml Aliquots auf den Filter getropft und durchgesaugt wurden.

Anschließend wurde in gleicher Weise mit 1 ml 70 %igem wäßrigem Alkohol gewaschen. Dann wurde die Filtrationseinheit 5 Minuten mit Luft getrocknet und anschließend mit 10 μl TE-Puffer, pH 7,5 unter Anlegung einer Spannung zur Elektroelution eluiert, wobei die Vakuumkammer 1 für die Elution ersetzt wurde durch eine 96 Loch-Mikrotiterplatte, deren einzelne Vertiefungen wieder mit den Bohrungen in den Verbundplatten 2 und 3 fluchteten.

Die so erhaltenen DNA-Präparate wurden als Template für die Sequenzierung sowohl mit radioaktiver Markierung als auch mit Fluoreszenzmarkierung des Primers eingesetzt. Als Enzym wurde das Klenow-Fragment der E.coli-DNA-Polymerase 1 oder T7-DNA-Polymerase verwendet. Dabei ergaben sich mit radioaktiver Markierung die besten Ergebnisse bei Anwendung von 1 %iger Essigsäurekonzentration und 4 M/l NaClO_4 , während mit Fluoreszenzmarkierung die besten Ergebnisse im Bereich von 1 bis 5 % Essigsäure und 4 bis 6 M NaClO_4 erzielt wurden.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Reingewinnung von rekombinanter M-13-ss-DNA durch Fällung des vom E.coli-Wirtsstamm ins Medium ausgeschleusten rekombinanten M-13-Phagen, Abtrennung aus dem Wachstumsmedium und Extraktion der Hüllproteine,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man aus dem Wachstumsmedium die M-13 Phagen mit Essigsäure fällt, die erhaltene Suspension über ein Glasfaserfilter filtrierte und das Glasfaserfilter mit einer Lösung chaotroper Ionen behandelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man als Chaotroplösung eine Perchloratlösung verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man eine 4 bis 8 M/l Perchloratlösung, pH 6,5 bis 8,5 verwendet.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man zur Fällung das Medium auf eine Endkonzentration zwischen 1 % und 10 % Essigsäure bringt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man das Glasfaserfilter nach der Behandlung mit der Lösung chaotroper Ionen mit wäbrigem Ethanol wäscht.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die gereinigte DNA vom Glasfaserfilter mit einer verdünnten wäßrigen Salzlösung eluiert.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Elution mit 0,5 bis 2 mM/l Tris-HCl, pH 7 bis 8, enthaltend 0,05 bis 0,2 mM/l EDTA durchführt.
8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens der Ansprüche 1 bis 7, gekennzeichnet durch eine Vakuumkammer 1, die mit einer Platte 2 abgedeckt ist, über welcher eine Platte 3 angeordnet ist und ein Glasfaserfilter 4 zwischen den Platten 2 und 3, wobei die Platten 2 und 3 eine Vielzahl miteinander fluchtender Bohrungen aufweisen und aus einer Sandwich-Struktur bestehen, bei der eine elektrisch leitfähige Metallplatte (2c, 3c) zwischen zwei isolierenden Kunststoffplatten (2a, 2b; 3a, 3b) angeordnet ist.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallplatten 2c, 3c Mittel zur Verbindung mit einer Spannungsquelle aufweisen.
10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bohrungen in der oberen Platte 3 trichterförmig, in der unteren Platte 2 zylindrisch ausgebildet sind.

11. Verwendung einer nach dem Verfahren der Ansprüche 1 bis 7 hergestellten M-13-ss-DNA für die DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode von Sanger.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 88/00659

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.⁴: C 12 N 15/00; C 12 N 11/68; C 12 M 1/34

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification Symbols

Classification System

Int.Cl.⁴

B 01 D; C 07 H; C 12 N; C 12 P; C 12 Q; G 01 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹

Category ¹⁰ Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² Relevant to Claim No. ¹³

- | | | |
|---|---|------|
| A | Chemical Abstracts, vol. 90, 1979, (Columbus, Ohio, US), see abstract No. 2778s, & Exp. Cell. Res. 1978, 115(2), 411-14 | 1-7 |
| A | Analytical Biochemistry, vol. 101, 1980, C.W. Chen et al.: "Recovery of DNA segments from agarose gels", pages 339-341 | 1-7 |
| A | GB, A, 2139349 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORP.) 7 November 1984, see page 1, lines 23-40; claims 1,2 | 1-7 |
| A | WO, A1, 87/02132 (JONES, KENNETH) 9 April 1987 see claims | 8-11 |
| A | WO, A1, 85/05631 (SVENSSON, STEFAN) 19 December 1985 see claims | 8-11 |

- * Special categories of cited documents: ¹⁰
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Δ" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

07 October 1988 (07.10.88)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Date of Mailing of this International Search Report

03 February 1988 (03.02.89)

Signature of Authorized Officer

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/EP88/00659
SA 23515**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 01/09/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A- 2139349	07-11-84	None	
WO-A- 87/02132	09-04-87	None	
WO-A- 85/05631	19-12-85	None	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 88/00659

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. 4. C 12 N 15/00; C 12 N 1 1/68; C 12 M 1/34		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Klassifikationssystem Int. Cl. 4		Recherchierte Mindestprüfstoff? Klassifikationssymbole B 01 D; C 07 H; C 12 N; C 12 P; C 12 Q; G 01 N
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13
A	Chemical Abstracts, Band 90, 1979, (Columbus, Ohio, US), siehe Zusammenfassung Nr. 2778s, & Exp. Cell. Res. 1978, 115(2), 411-14	1-7
A	Analytical Biochemistry, Band 101, 1980, C.W. Chen et al.: "Recovery of DNA segments from agarose gels", Seiten 339-341	1-7
A	GB, A, 2139349 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORP.) 7. November 1984 siehe Seite 1, Zeilen 23-40; Ansprüche 1,2	1-7
A	WO, A1, 87/02132 (JONES, KENNETH) 9. April 1987 siehe Ansprüche	8-11
A	WO, A1, 85/05631 (SVENSSON, STEFAN) 19. Dezember 1985 siehe Ansprüche	8-11
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche 7. Oktober 1988		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts - 3 FEB 1989
Internationale Rechercheneinrichtung Europäisches Patentamt		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten M. VAN MOL

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

PCT/EP88/00659

SA 23515

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

01/09/88

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB-A- 2139349	07-11-84	Keine	
WO-A- 87/02132	09-04-87	Keine	
WO-A- 85/05631	19-12-85	Keine	

EPD FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtssblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)